

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

後藤 亮 真

論文題目

Ge1MA を応用した新規骨芽細胞移植法による骨再生療法
法の基礎研究

I. 緒言

ティッシュエンジニアリングの重要な3つの要素は細胞、成長因子、足場の3つである。その中で足場は、細胞が成長するのに適切な3次元の環境作りや細胞が接着し、コロニーを形成するために重要である。足場は、細胞の増殖、分化、生合成の助力をする生体の細胞外マトリックスの作用と類似しており、再生誘導部位に置かれた足場は、不必要な細胞が作用部位に侵入することを防ぐことも可能である。本研究では足場材料として用途が高く比較的安価で安全性の高い光重合可能な材料である、Gelatin methacryloyl (GelMA)に着目した。多くの研究で用いられているGelMAハイドロゲルは一般的にUVによって光感受性物質の存在下で励起され硬化する。しかしながら、GelMA溶液を硬化させる際のUV照射は、正常な細胞に損傷を引き起こす可能性がある。そこでUV照射による細胞に対する為害作用を減少させるため、可視光線によって励起される光感受性物質のリボフラビン(RF)に着目した。本研究の目的は、骨欠損へ骨芽細胞を移植する際に、足場としての安全で理想的な環境を検討することであり、骨欠損に移植する骨芽細胞の足場として、光重合開始剤のRFを用い硬化する新しいGelMAハイドロゲルの作製方法及び骨芽細胞の分化誘導に与える影響を検討した。

II. 材料および方法

1. GelMA溶液の作製

GelMA 溶液は過去の報告の作成方法に従い作製した。DMEM 培地を加えた GelMA 溶液に、光感受性物質であるイルガキュア 2959 (IR)、リボフラビン (RF)、トリエタノールアミンを、それぞれ加え、37°C で 20%GelMA-RF 溶液、GelMA-IR 溶液を作製した。

2. GelMA ハイドロゲルの作製

20%GelMA-IR 溶液を、規格化したシリコンモールドに流し込み UV 照射器にて光重合を行った。照射は 8.5cm の距離で 20 秒間照射した。次に 20%GelMA-RF 溶液を、同じシリコンモールドに流し込み可視光線照射器で 0.5cm の距離にて 20 秒、60 秒照射し光重合を行った。

3. 機械的安定性

GelMA ハイドロゲルの圧縮弾性率を、インストロン万能試験機を用いて細胞の非存在下で 1 分あたり 20%の変形速度で荷重を測定し、圧縮弾性率は 5~10%の変形領域の勾配から算出した。

4. 細胞培養および 2 次元環境における骨芽細胞分化誘導

細胞は KUSA-A1 細胞を用い、DMEM 培地にて、細胞培養用のプラスチック平面プレートで 37°C、5%CO₂存在下で培養した。骨芽細胞分化は、骨分化誘導後に 7 日間培養し、アリザリンレッド溶液で染色し検出した。

5. 細胞内包と細胞生存率

作製した GelMA-IR 溶液、GelMA-RF 溶液に KUSA-A1 細胞を懸濁し、シ

リコンモールドに流し込み、GelMA-IR 溶液に対し UV 照射器で 20 秒間、GelMA-RF 溶液に対し可視光線照射器で 60 秒間、それぞれ光重合させた。光重合後、KUSA-A1 細胞を内包した GelMA-IR、GelMA-RF を DMEM 培地で培養し 1 日後、細胞生存率を調べた。

6. GelMA ハイドロゲルに内包した骨芽細胞の骨分化誘導

GelMA-RF 溶液に KUSA-A1 細胞を懸濁し、セルカルチャーインサートに注ぎ入れ、可視光線照射器で 60 秒間照射し光重合後、DMEM 培地または分化誘導培地にて 1 週間培養した。

7. Real-time quantitative PCR(qPCR)解析

7 日間培養した細胞の total RNA を ISOGEN を用いて抽出し、DNA は通法にしたがい $1 \mu\text{g}$ の total RNA を、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix を用いて総量を $20 \mu\text{L}$ にて合成した。PCR は、StepOne Real-Time PCR System を使用し、Taqman Universal Master Mix II および Runx2、Osx、Bsp、Ocn を用いた。データ解析は $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いた。

8. 統計分析

全てのデータは、平均値 \pm 標準偏差で表した。統計学的解析には統計解析ソフト SPSS ver.18 を用いた。検定には、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用い、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. GelMA-IR、GelMA-RF ハイドロゲルの物理的及び機械的性質

可視光線照射器にて 20 秒間照射し光重合させた 20%GelMA-RF はやや黄色味がかっており、未重合の RF が残存していると考えられ、シリコンモールドから取り外すことができなかつた。また、GelMA-RF を 10~15%の濃度で作製し 60 秒間照射しても、シリコンモールドから取り外すことができず、ゲル化を確認できなかつた。GelMA-RF 溶液の濃度を 20%、照射時間を 60 秒間に設定することで完全に透明になり、ゲル化を確認することができた。GelMA-RF ハイドロゲルと前述した条件で作製した GelMA-IR ハイドロゲルの圧縮弾性率をそれぞれ 5 サンプルずつ測定したところ圧縮弾性率に有意な差は見られなかつた。

2. UV/可視光線照射による GelMA ハイドロゲルに内包した細胞生存率

GelMA ハイドロゲル内に KUSA-A1 細胞を内包し UV にて 20 秒間、可視光線にて 60 秒間照射し光重合させ、1 日培養後の細胞生存率を調べた結果、GelMA-RF ハイドロゲルに内包した KUSA-A1 細胞が有意に高い細胞生存率を示した。

3. 2次元環境における KUSA-A1 細胞の骨分化能の評価

KUSA-A1 細胞を分化誘導培地にて 7 日間培養後、アリザリンレッド染色を行った結果、カルシウム沈着は劇的に増加した。次に、7 日間培養後の KUSA-A1 細胞を回収し qPCR 解析を行った。その結果、2次元環境下で分

化誘導した KUSA-A1 細胞は、DMEM 培地のみで培養した場合と比較し、Bsp の発現が著しく高かった。

4. GelMA ハイドロゲルに内包した KUSA-A1 細胞の骨形成関連遺伝子の発現

GelMA-RF ハイドロゲル内で培養した KUSA-A1 細胞は、凝集しスフェロイド様を呈していた。3次元環境下で培養した KUSA-A1 細胞の骨形成関連遺伝子の発現は、3次元環境で分化誘導培地にて培養した KUSA-A1 細胞の骨形成関連遺伝子と比較すると Ocn の発現が劇的に上昇していた。さらに、骨分化早期のステージで発現が見られる Runx2、Osx は3次元分化培養条件下では減少していた。

IV. 考察

多くの骨組織工学アプローチによって盛んに研究されている足場材料としてのハイドロゲルは、組織工学や再生医療で幅広く使われている。細胞移植治療の中で、間葉系幹細胞(MSC)は、骨再生治療の領域に、最も使用されている細胞である。MSC は、*in vitro* で軟骨細胞、骨芽細胞と脂肪細胞と少なくとも3種類の中胚葉由来の細胞に分化することができるが、MSC がどのように分化するかは、3次元培養時の足場の硬さに依存することが証明されている。25~40 kPa の硬さのゲル上で、MSC は骨形成マーカーを発現すること 11~30kPa の硬さのゲル内で、7日後には骨芽細胞に成熟分化する

ことが報告されている。本研究で使用した 20%GelMA-RF ハイドロゲルの圧縮弾性率は、約 16kPa で、3次元環境での培養における骨芽細胞の分化に適した硬さであったと考えられる。圧縮弾性率だけでなく、さらなる物理的・機械的性質が必要であると考えられる。過去の研究に使われている GelMA ハイドロゲルは、UV 照射による光重合で作製されるものが大部分である。本研究では UV 照射と比較し、可視光線照射は細胞生存率が優位に高かったことを示しており RF、IR は生体に悪影響を及ぼさない物質であることから、可視光線照射による光重合は骨芽細胞に対して細胞為害性が少ないことが示唆される。過去の報告では骨芽細胞の分化培養時に Runx2 と Osx が初期段階の骨芽細胞で高度に発現したことが確認されており、これと対照的に、Bsp と Ocn は骨分化の後期の段階で発現することが報告されている。GelMA-RF ハイドロゲルに内包された KUSA-A1 細胞を分化誘導培地にて培養したところ Bsp、Ocn の遺伝子発現が特に高く認められ、GelMA-RF ハイドロゲルに内包し分化誘導培地で培養した KUSA-A1 細胞は、Runx2 と Osx の mRNA は発現が低かった。また、GelMA-RF ハイドロゲル内で培養された KUSA-A1 細胞は、日を追うごとに凝集しスフェロイド状を示した。これより GelMA-RF ハイドロゲルで培養された骨芽細胞は、強力に分化し、成熟した可能性が示唆された。本研究において、GelMA-RF ハイドロゲルでの細胞培養は、*in vitro* において骨芽細胞の骨形成を促すのに適

していることが明らかになった

V. まとめ

GelMA-RF ハイドロゲルは、骨組織再生のための極めて有用な足場材料として使用できる可能性が示唆された。